



⑲ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 44 07 837 C 1

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 07 K 14/435  
C 07 K 1/18

⑳ Aktenzeichen: P 44 07 837.4-41  
㉔ Anmeldetag: 9. 3. 94  
㉕ Offenlegungstag: —  
㉖ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 17. 8. 95

DE 44 07 837 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:  
Octapharma AG, Ziegelbrücke, CH

⑦④ Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

⑦② Erfinder:  
Strancar, Alex, Ajdovscina, SI; Josic, Djuro, Dr.,  
Wien, AT; Nur, Israel, Bnei Brak, IL

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
EP 03 37 144

⑤④ Verfahren zur Gewinnung von hochreinem, virusinaktiviertem  $\alpha_1$ -Antitrypsin mittels  
Anionenaustauscher-Chromatographie

⑤⑦ Verfahren zur Gewinnung von hochreinem, virusinaktivier-  
tem  $\alpha_1$ -Antitrypsin mittels Anionenaustauscher-Chromato-  
graphie aus Kryopräzipitat mittels sogenannter Tentakelma-  
terialien, wobei neben oder anstelle der herkömmlichen  
Säulen-Chromatographie auch die Membran-Chromatogra-  
phie mit entsprechend modifizierten Oberflächen eingesetzt  
werden kann.

DE 44 07 837 C 1

## Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem, virusinaktiviertem  $\alpha_1$ -Antitrypsin mittels Anionenaustauscher-Chromatographie aus diesen Faktor enthaltenden Quellen.

$\alpha_1$ -Antitrypsin gehört zur Superfamilie der Serpine und ist ein Serumprotein (Antienzym)  $\alpha_1$ -Antitrypsin besitzt Anti-elastase-Aktivität. Bei Verlust der Inhibitor-Aktivität infolge eines genetischen Defekts kommt es zum Abbau des Struktur-Proteins Elastin und infolgedessen zu Lungenemphysemen.

Die EP 0 282 363 A2 betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentrats aus einer Fraktion menschlichen Plasmas. Die Isolierung erfolgt dabei mit Hilfe der Chromatographie und liefert eine Fraktion  $\alpha_1$ -Antitrypsin mit einer Ausbeute von mindestens 80%. Die Chromatographie erfolgt an DEAE-Sephrose CL.

M.H. Coan et al. beschreibt in Vox Sang. 48 : 333 bis 342 (1985) die Reinigung von  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ausgehend von einer Cohn-Fraktion IV-1 durch eine Polyethylenglykol-Präzipitation mit nachfolgender Chromatographie an DEAE-Sephrose. Die Ausbeuten an  $\alpha_1$ -Antitrypsin betragen ungefähr 60% (bestimmt durch spezifische Aktivität gegenüber 100% reinem Protein).

Die Cohn-Fraktion wird erhalten gemäß Cohn E.J. et al., Preparation and properties of serum and plasmaproteins IV. A System for the preparation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids, Journal of American Chemical Society 68 : 459 bis 457, 1946.

Die DE 42 06 694 beschreibt die Eignung eines Materials, welches aus der EP 0 337 144 bekannt ist, zur Isolierung von Faktor VIII aus entsprechenden Fraktionen.

Die WO 90/14886 beschreibt Materialien zur Chromatographie mit Polyalkylaminketten, die an der Oberfläche eines chromatographischen Trägers verankert sind. Dies bedeutet, daß unbedingt die den endständigen funktionellen Rest tragende Gruppe über Stickstoffatome mit dazwischenliegenden Alkylengruppen an diese Oberfläche gebunden sind. Diese Polyaminingruppierungen sind über Kupplungsreagenzien mit der das Chromatographiematerial bildenden Matrix verbunden. Dazu werden Substanzen wie Cyanogenbromid, Epichlorhydrin, Carbonyldiimidazol oder 1,4-Butandiol diglycidylether verwendet. Diese "linking group" wird dadurch charakterisiert, daß sie bis zu 10 Kohlenstoffatome enthalten soll, die durch Sauerstoffatome unterbrochen sein kann und weitere Substituenten wie Hydroxyl oder Oxo-Gruppen enthalten kann.

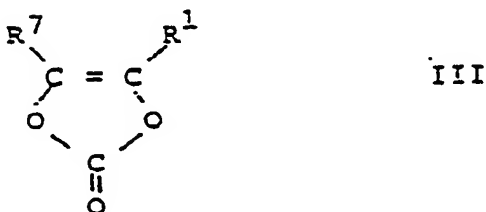
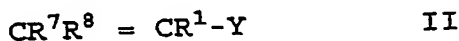
Die EP 0 343 275 A1 beschreibt die Reinigung von Faktor VIII mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie, wie beispielsweise TSK DEAE-Fratogel.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem ist die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem sich die Isolierung von biologisch aktivem  $\alpha_1$ -Antitrypsin aus diesen Faktor enthaltenden Quellen verbessern läßt und eine wirtschaftlichere Arbeitsweise gewährleistet.

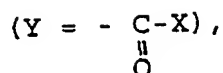
Überraschenderweise wird dieses Problem gelöst durch ein Verfahren gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die erfindungsgemäß zu verwendenden Trennmaterialien bestehen aus Trägerteilchen wie sie in der EP-A-0 337 144 offenbart werden. Dies sind Trägerteilchen mit Hydroxylgruppen, auf die über die  $\alpha$ -C-Atome der Hydroxylgruppen ein polymeres Material aufgepfropft ist. Als Trägerteilchen kommen alle allgemein bekannten porösen und unporösen Chromatographieträger, die primäre oder sekundäre, aliphatische Hydroxylfunktionen an der Oberfläche aufweisen, in Frage. Dabei sind bevorzugt hydrophile Polymere auf Acrylat- und Methacrylatbasis, Polymere auf Polyvinylalkohol-Basis, diolsubstituierte Kieselgele, Polysaccharide auf Agarose-Basis, Cellulose, Cellulosederivate oder Polymere auf Dextran-Basis. Es können aber selbstverständlich auch andere Polymere oder Copolymere auf der Grundlage von Monomeren wie Vinylverbindungen, Acrylamid, (Meth)-Acrylsäureestern oder (Meth)-Acrylnitril in hydroxylierter Form eingesetzt werden.

Das polymere Material, das über die  $\alpha$ -C-Atome der Hydroxylgruppen an die Trägerteilchen gebunden ist, basiert auf den Monomeren der Formeln II und/oder III.



Diese Monomeren stellen (Meth)Acrylsäure ( $\text{Y} = -\text{COOH}$ ), (Meth)-Acrylsäurederivate



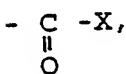
Allylamine ( $Y = -CH_2NH_2$ ,  $-CH_2NR^2R^3$ ), (Meth)-Acrylnitril ( $Y = -CN$ ), Acroleine ( $Y = -CHO$ ), Vinylcarboxylate ( $Y = -OCOCHR^5R^6$ ) oder Vinylencarbonate der Formel III dar.

Alle diese Monomere stellen in wäßriger Lösung radikalisch polymerisierbare Substanzen mit reversibel bindenden Gruppen dar, die neutral, sauer oder basisch sein können.

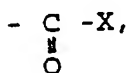
Werden als Monomere Vinylencarbonate der Formel III oder Vinylcarboxylate  $CR^7R^8 = CR^1 - OCOCHR^5R^6$  der Formel II eingesetzt, so wird vorzugsweise das erhaltene Produkt anschließend in ein Trennmateriale mit Hydroxylgruppen überführt. Diese Überführung in eine Hydroxyl-Phase wird durch eine an sich bekannte milde alkalische oder saure Verseifung erreicht. Beispielsweise kann die Reaktion mit methanolischer  $K_2CO_3$ -Lösung bei Raumtemperatur, beschrieben z. B. von Y. Tezuka et al., in *Macromol. Chem.* 186, 685—694 (1985), durchgeführt werden.

In den Formeln I, II und III bedeutet  $R^1$  vorzugsweise H, d. h. die Acrylsäurederivate sind bevorzugt.

Y in Formel II bedeutet vorzugsweise



$-OCOCHR^5R^6$  oder  $-CH_2NH_2$ , in zweiter Linie bevorzugt  $-CN$  oder  $-CHO$ . Dementsprechend bedeutet Y in Formel I in erster Linie bevorzugt



$-OH$  (da vorzugsweise die  $-OCOCHR^5R^6$ -Gruppe in eine Hydroxylphase umgewandelt wird) oder  $-CH_2NH_2$ , in zweiter Linie bevorzugt  $-CN$  oder  $-CHO$ .

$R^5$  und  $R^6$  bedeuten unabhängig voneinander H oder eine Alkylgruppe mit bis zu 5 C-Atomen. Vorzugsweise ist mindestens einer der Reste  $R^5$  und  $R^6$  H. Folgende Reste sind besonders bevorzugt: Acetyloxy-, Propionyloxy-, Butyryloxy-, Valeryloxy- und Hexanoyloxy-Rest.

X bedeutet sowohl in Formel I als auch in Formel II  $-OR^4$ ,  $-OH$  oder  $-NR^2R^3$ , vorzugsweise  $-NR^2R^3$ .

Bevorzugt sind dabei Verbindungen, in denen X  $-NR^2R^3$  bedeutet und einer der Reste  $R^2$  und  $R^3$  H ist.

Die Reste  $R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten bevorzugt eine Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe, wobei die Alkyl- und/oder die Phenylgruppe ein- oder mehrfach, vorzugsweise ein- oder zweifach, insbesondere bevorzugt einfach, substituiert sein kann durch einen Alkoxy-, Cyano-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-, Sulfonsäure-, Acetoxy- oder Acetamino-Rest.

Die Reste  $R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten bevorzugt Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Cyanoalkyl-, Aminoalkyl-, Mono- oder Dialkylaminoalkyl-, Trialkylammoniumalkyl-, Carboxyalkyl- oder Sulfonsäurealkyl mit bis zu 10 C-Atomen, bevorzugt bis zu 6 C-Atomen, insbesondere bevorzugt bis zu 4 C-Atomen in der Alkylgruppe, die linear oder verzweigt sein kann.  $R^2$  und/oder  $R^3$  bedeuten demnach bevorzugt Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Methoxymethyl-, Ethoxymethyl-, 2-Methoxyethyl-, 2-, 3- oder 4-Oxapentyl-, 2-, 3-, 4- oder 5-Oxahexyl-, 2-, 3-, 4-, 5-Methoxyethyl-, Isopropyl-, 2-Butyl-, Isobutyl-, 2-Methylbutyl-, Isopentyl-, 2-Methylpentyl-, 3-Methylpentyl-, 2-Oxa-3-methylbutyl-, 3-Oxa-4-methylbutyl-, 2-Methyl-3-oxapentyl-, 2-Methyl-3-oxahexyl-, ferner auch Heptyl-, Octyl-, Nonyl- oder Decyl-.

Ferner bevorzugt sind auch Alkylgruppen, die durch eine Cyano-, Carboxy- oder Sulfonsäuregruppe substituiert vorliegen. Demnach bedeuten  $R^2$  und/oder  $R^3$  bevorzugt Cyanomethyl-, Cyanoethyl-, Cyanopropyl-, Cyanobutyl-, Cyanopentyl-, Cyanoethyl-, 2-Cyanopropyl-, 2-Cyanobutyl-, Carboxymethyl-, Carboxylethyl-, Carboxylpropyl-, Carboxylisopropyl-, Carboxylbutyl-, Carboxylpentyl-, Carboxylhexyl-, Carboxyl-2-methylpropyl-, Carboxyl-2-methylbutyl-, Sulfonsäuremethyl-, Sulfonsäureethyl-, Sulfonsäurepropyl-, Sulfonsäurebutyl-, Sulfonsäurepentyl-, Sulfonsäurehexyl-, Sulfonsäure-2-methylpropyl-, Sulfonsäure-2-methylbutyl-, Sulfonsäure-3-methylbutyl-, Sulfonsäure-2-methylpentyl-, Sulfonsäure-3-methylhexyl- oder Sulfonsäure-2-ethylpentyl-.

Ferner sind die Alkylgruppen bevorzugt einfach substituiert durch eine Amino-, Mono- oder Dialkylamino- oder Trialkylammoniumgruppe. Die Alkylgruppen können dabei gleich oder verschieden sein und bis zu 10, vorzugsweise bis zu 6 C-Atomen, insbesondere bevorzugt bis zu 4 C-Atomen, besitzen und bedeuten demnach vorzugsweise Dimethylaminoethyl-, Diethylaminoethyl-, Methylaminoethyl-, Methylaminopropyl-, Dimethylaminopropyl-, Ethylaminoethyl-, Propylaminoethyl-, Propylaminopropyl-, Dipropylaminoethyl-, Dipropylaminobutyl-, Diethylaminoethyl-, Trimethylammoniumethyl-, Trimethylammoniumpropyl-, Trimethylammoniumbutyl-, Triethylammoniumethyl-, Triethylammoniumpropyl-, Triethylammoniummethyl-, Aminoethyl-, Aminopropyl-, Aminobutyl- oder Aminopentyl-. Alle diese Alkyl- und substituierten Alkylgruppen sind ebenfalls bevorzugt als Substituenten an der Phenylgruppe.

Bevorzugt für  $R^2$  und/oder  $R^3$  ist auch ein Sulfonsulfid der Struktur  $-(CH_2)_n-SO_2-(CH_2)-S-(CH_2)_n-OH$  mit  $n = 2, 3, 4, 5$  oder 6, vorzugsweise 2, 3 oder 4.

Vorzugsweise hat  $R^2$  und/oder  $R^3$  auch die Bedeutung einer Phenylgruppe, die vorzugsweise einfach substituiert ist durch Cyano, Cyanoalkyl, Amino, Aminoalkyl, Mono- oder Dialkylamino, Alkyl, Alkoxy, Alkoxyalkyl, Mono- oder Dialkylaminoalkyl, Trialkylammonium- oder Trialkylammoniumalkyl, Carboxy, Carboxyalkyl, Sulfonsäure oder Sulfonsäurealkyl. Die bevorzugten Bedeutungen dieser Substituenten entsprechen den vorstehend angegebenen bevorzugten Alkylgruppen und substituierten Alkylgruppen. Der Substituent an der Phenylgruppe sitzt vorzugsweise in p-Stellung.

p-Acetoxyphenyl, p-Aminophenyl oder p-Acetaminophenyl sind ebenfalls bevorzugte Bedeutungen für  $R^2$  und/oder  $R^3$ .

Bevorzugt für  $R^2$  und/oder  $R^3$  ist ferner eine Alkylphenyl oder Phenylalkylgruppe, wobei ebenfalls die angegebenen bevorzugten Bedeutungen für die Alkyl-, substituierten Alkyl- oder substituierten Phenylgruppen gelten sollen.

Demnach gelten folgende substituierte Phenylgruppen beispielsweise als besonders bevorzugt: 4-Cyanophenyl, 4-Alkylphenyl, 4-(N,N-Dimethylamino)-phenyl, 4-(N,N-Dialkylaminoethyl)-phenyl, 4-Ethoxyphenyl, 4-Ethoxyethylphenyl, 4-Trialkylammoniumphenyl, 4-Carboxylphenyl, 4-Sulfonsäurephenyl, Phenylethyl, 4-(N-Ethylamino)phenylpropyl oder 4-Cyanophenylethyl.

Des weiteren sind Einheiten der Formel I bzw. Monomere der Formel II bevorzugt, in denen  $R^2$  und/oder  $R^3$  einen cyclischen oder bicyclischen Rest, der aromatisch oder gesättigt sein kann, mit 5 bis 10 C-Atomen, worin ein- oder mehrere CH- oder  $CH_2$ -Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, bedeuten.

$R^2$  und  $R^3$  bedeuten demnach bevorzugt auch einen Pyridinrest, Imidazolylrest, Indolylrest, ferner bevorzugt einen Pyrrol-, Pyrimidin-, Pyrazin-, Chinolin- oder Isochinolinrest.

$R^2$  und/oder  $R^3$  können beispielsweise auch einen Thiazol-, Thiadiazol-, Morpholin-, Triazin-, Piperazin-, Benzothiazol-, Purin-, Pyrazol-, Triazol-, Pyrrolidin- oder Isoxazol-Rest bedeuten.

Insbesondere bevorzugt sind dabei die aromatischen, heterocyclischen Reste.

Die Reste  $R^2$  und  $R^3$  müssen, um zu geeigneten Austauschern zu gelangen, so aufeinander abgestimmt werden, daß entweder beide Reste eine saure oder basische Gruppe enthalten oder aber einer der Reste neutral ist. Dem Fachmann bereitet es keine Schwierigkeit, die Gruppen entsprechend zuzuordnen und somit geeignete Reste für  $R^2$  und  $R^3$  zusammenzustellen, je nach Funktion und Aufgabe des gewünschten Ionenaustauschers.

Vorzugsweise ist einer der beiden Reste  $R^2$  und  $R^3$  ein neutraler Rest.

$R^4$  bedeutet bevorzugt Alkyl, Alkoxyalkyl, Cyanoalkyl, Carboxyalkyl oder Sulfonsäurealkyl mit bis zu 10 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, insbesondere bevorzugt mit bis zu 4 C-Atomen in der Alkylgruppe, die linear oder verzweigt sein kann.  $R^4$  bedeutet demnach bevorzugt Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Hexyl, Methoxymethyl, Ethoxymethyl, 2-Methoxyethyl, 2-, 3- oder 4-Oxapentyl, Isopropyl, 2-Butyl, Isobutyl, 2-Methylbutyl, Isopentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 2-Oxa-3-methylbutyl, 3-Oxa-4-methylbutyl, 2-Methyl-3-oxapentyl oder 2-Methyl-3-oxahexyl.

Ferner bevorzugt sind auch Alkylgruppen, die durch eine Cyano, Carboxy- oder Sulfonsäuregruppe substituiert vorliegen. Demnach bedeutet  $R^4$  bevorzugt Cyanomethyl, Cyanoethyl, Cyanopropyl, Cyanobutyl, Cyanopentyl, Cyanoethyl, 2-Cyanopropyl, 2-Cyanobutyl, Carboxymethyl, Carboxylethyl, Carboxylpropyl, Carboxylisopropyl, Carboxylbutyl, Carboxylpentyl, Carboxylhexyl, Carboxyl-2-methylpropyl, Carboxyl-2-methylbutyl, Sulfonsäuremethyl, Sulfonsäureethyl, Sulfonsäurepropyl, Sulfonsäurebutyl, Sulfonsäurepentyl, Sulfonsäurehexyl, Sulfonsäure-2-methylpropyl, Sulfonsäure-2-methylbutyl, Sulfonsäure-3-methylbutyl, Sulfonsäure-2-methylpentyl, Sulfonsäure-3-methylhexyl oder Sulfonsäure-2-ethylpentyl.

Alle diese Alkyl- und substituierten Alkylgruppen sind ebenfalls bevorzugt als Substituenten an der Phenylgruppe.

Vorzugsweise hat  $R^4$  auch die Bedeutung einer Phenylgruppe, die vorzugsweise einfach substituiert ist durch Cyano, Cyanoalkyl, Alkyl, Alkoxy, Alkoxyalkyl, Carboxy, Carboxyalkyl, Sulfonsäure oder Sulfonsäurealkyl. Die bevorzugten Bedeutungen dieser Substituenten entsprechen den vorstehend angegebenen bevorzugten Alkylgruppen und substituierten Alkylgruppen. Der Substituent an der Phenylgruppe sitzt vorzugsweise in p-Stellung.

$R^7$  und  $R^8$  in den Monomeren der Formel II bedeuten vorzugsweise H, und damit haben auch  $R'$  und  $R''$  in Formel I vorzugsweise die Bedeutung Wasserstoff.

Bevorzugt sind auch Trennmaterialien, bei denen in Formel I  $Y = -OH$  ist und einer der Reste  $R'$  und  $R''$  ebenfalls  $-OH$  bedeutet. Als Monomeres muß dann ein Vinylencarbonat der Formel III eingesetzt werden, und das bei der Polymerisation entstandene Produkt anschließend in eine Hydroxylphase überführt werden.

$R^7$  und  $R^8$  in Formel III bedeuten vorzugsweise H. n in Formel I stellt die Anzahl der wiederkehrenden Einheiten dar und bedeutet 2—100, vorzugsweise 5—60, insbesondere sind Kettenlängen von 10—30 bevorzugt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von hochreinem, virusinaktiviertem  $\alpha_1$ -Antitrypsin mittels Anionenaustauscher-Chromatographie geht vorzugsweise davon aus, daß die sogenannte Cohn IV-1-Fraktion aus einem Auftragungspuffer auf eine Chromatographie-Säule gegeben wird, welche mit einem Anionenaustauscher, wie oben beschrieben, beschickt ist. Der Auftragungspuffer ist eine wäßrige Lösung mit relativ geringer Ionenstärke. Nach dem Auftragen der Cohn-Fraktion aus dem wäßrigen System geringer Ionenstärke wird das Chromatographiematerial gegebenenfalls mit einer Lösung entsprechend einer Ionenstärke von 5 bis 35 mM Natriumchlorid und Natriumacetat bei pH 4 bis 5,5, vorzugsweise bei pH 4,5. Damit können mit dem  $\alpha_1$ -Antitrypsin vergesellschaftete Proteine entfernt werden.

Nach gegebenenfalls einem oder mehreren Waschschritten folgt dann die Elution des noch an dem chromatographischen Material adsorbierten  $\alpha_1$ -Antitrypsins. Die wäßrige Lösung, die zur Elution des  $\alpha_1$ -Antitrypsins eingesetzt werden kann (Elutionspuffer), zeichnet sich durch eine relativ hohe Ionenstärke aus, vorzugsweise entsprechend einer 50 bis 300 mM Natriumchloridkonzentration in einem geeigneten Puffer wie 25 bis 37 mM

Tris/HCl in alkalischem Milieu (pH 7,4 bis 9,2). An die Elution kann sich dann gegebenenfalls eine weitere Prozeßierung anschließen wie Entsalzungsschritte und andere übliche Konzentrierungsschritte bis hin zur Gefriertrocknung des Eluats.

Es kann vorteilhaft sein, an die erste Chromatographie eine zweite Chromatographie an Umkehrphasen-Materialien durchzuführen. Als besonders geeignet, hat sich hierbei Octyl-Sepharose herausgestellt.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens können die chromatographischen Schritte mittels der Membran-Chromatographie durchgeführt werden. Dabei kommen sowohl Membranen aus Cellulose oder synthetischen Fasern, als auch kompakte Disks z. B. aus Polyglycidylmethacrylat in Frage. Vorzugsweise weisen die Membran-Systeme covalent gebundene Anionenaustauschergruppen der oben genannten Art auf zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Falls ein zweiter chromatographischer Trennungsschritt mittels Membran-Chromatographie eingesetzt wird, werden solche Membran-Systeme eingesetzt, die eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem zu trennenden  $\alpha_1$ -Antitrypsin eingehen können. Vorzugsweise sind diese hydrophoben Gruppen kovalent an das die Membran bildende Material gebunden.

Zur Vermeidung der Übertragung infektiöser viraler Erkrankungen empfiehlt sich ein Virusinaktivierungs- oder Virusentfernungsschritt. Ein allgemein anerkanntes Verfahren ist hierbei die Virusinaktivierung mit Di- oder Trialkylphosphaten und nicht ionischen Detergenzien wie sie von Horowitz et al. in EP 0 131 740 beschrieben wird.

Woods, K. und Orme, Th. beschreiben in der EP-A-0 239 859, daß es von Vorteil ist, nach der Virusentfernung oder -inaktivierung und vor der chromatographischen Trennung die Probe mit Ölen zu extrahieren, vorzugsweise mit Sojaöl, Rizinöl und/oder Baumwollsaamenöl.

Durch die erfindungsgemäßen Maßnahmen ist es erstmals möglich, in hohen Ausbeuten hochreines  $\alpha_1$ -Antitrypsin herzustellen, das eine bisher nicht erreichte spezifische Aktivität aufweist.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin soll im folgenden die Cohn IV-1-Fraktion dienen. Diese wird aufgenommen in 35 mM Tris/HCl, bei einem pH von 8,2 (Puffer 1). Die Fraktion wird vorzugsweise bei etwas erhöhter Temperatur mit dem Puffer 1 behandelt.

Daran schließt sich die Virusinaktivierung an, indem etwa 10 g/l Tween 80 und 3 g/l TNBP 6 Stunden bei 30°C mit der Probe im Auftragungspuffer (Puffer 1) geführt werden.

An diesen Schritt können sich dann gegebenenfalls Schritte zur Vorreinigung und Entfernung der Detergenzien anschließen, wie in der EP 0 239 859 beschrieben.

Gewünschtenfalls kann auch eine Inaktivierung von Viren, die nicht mit Lipidhüllen versehen sind, erfolgen. Dies erfolgt vorzugsweise gemäß einem Verfahren wie es in der P 43 18 435.9 vorgeschlagen wird. Dabei wird die entsprechende zu behandelnde Fraktion mit einer wirksamen Menge von Di- oder Trialkylphosphaten und gegebenenfalls Benetzungsmitteln gleichzeitig oder aufeinanderfolgend bei einer erhöhten Temperatur im Bereich von 55°C bis 77°C für eine Zeitdauer von 5 bis 30 Stunden behandelt.

Die Menge an Detergenz kann vorzugsweise in einem Bereich von 1 bis 15 Gew.-% eingesetzt werden.

Die erste Chromatographie erfolgt dann an einem Anionenaustausch-Chromatographiematerial, welches vorzugsweise das kommerziell erhältliche Fraktogel® EMD-DEAE (M) ist.

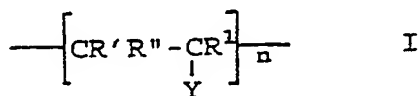
Die Chromatographie-Säule mit dem oben genannten Material wird mit dem Auftragungspuffer (Puffer 1) äquilibriert. Dann wird die Cohn IV-1-Fraktion auf die Säule gegeben und vorzugsweise mit einer 10 mM Natriumchloridlösung, die mit 20 mM Natriumacetat bei pH 4,6 gepuffert ist, gewaschen. Daran schließt sich dann die Elution der  $\alpha_1$ -Antitrypsin enthaltenden Fraktion, beispielsweise mit 150 mM Natriumchloridlösung, die mit 30 mM Tris/HCl bei pH 8,2 gepuffert ist, an. Die erhaltene Fraktion wird gegebenenfalls einem weiteren Reinigungsschritt an Octyl-Sepharose unterworfen. Eine Entsalzung kann ebenfalls durchgeführt werden beispielsweise durch Diafiltration oder andere an sich bekannte Entsalzungsmaßnahmen. Danach kann die mit  $\alpha_1$ -Antitrypsin hoch angereicherte Fraktion beispielsweise durch Lyophilisation getrocknet werden.

Die Chromatographie-Säule kann mit einer 0,5 M Natriumchloridlösung mit 30 mM Tris/HCl bei pH 8,2 gepuffert, regeneriert werden.

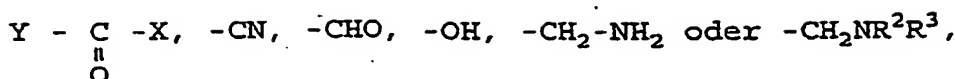
Die Ausbeute an aktivem  $\alpha_1$ -Antitrypsin beträgt 70 bis 80% (gemessen durch elektrophoretische Analyse).

#### Patentansprüche

- Verfahren zur Gewinnung von hochreinem, virusinaktiviertem  $\alpha_1$ -Antitrypsin mittels Anionenaustauscher-Chromatographie aus Blutplasma oder Kryopräzipitat, dadurch gekennzeichnet, daß als Anionenaustauschermaterial ein Trennmateriale verwendet wird auf Basis von hydroxylgruppenhaltigen Trägern, deren Oberflächen mit kovalent gebundenen Polymeren beschichtet sind, die Polymeren gleiche oder verschiedene wiederkehrende Einheiten der Formel I enthalten,



worin  
R' H oder CH<sup>3</sup>



R' und R'' jeweils H oder CH<sub>3</sub>, und falls Y = -OH kann einer der Reste R' und R'' auch -OH sein, X -OH, -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> oder -OR<sup>4</sup>,

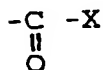
R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> jeweils eine Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, wobei diese Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können durch Alkoxy-, Cyano-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Trialkylammonium-, Carboxyl-, Sulfonsäure- Acetoxy- oder Acetamino-Reste, einen cyclischen oder bicyclischen Rest mit 5 bis 10 C-Atomen, worin eine oder mehrere CH- oder CH<sub>2</sub>-Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, oder ein Sulfonsulfid der Struktur -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> S(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH mit n = 2-6 bedeuten und einer der Reste

R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> auch H bedeuten kann, wobei R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> so aufeinander abgestimmt sind, daß entweder beide Reste sauer oder basisch oder einer oder beide der Reste neutral sind,

n 2 bis 100,

und R<sup>4</sup> eine Alkyl-, Phenyl-, Phenylalkyl- oder Alkylphenylgruppe mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, wobei diese Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können durch Alkoxy-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfonsäure- oder Acetoxy-Reste, bedeutet, aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Y in der Formel I des Anspruchs 1



mit X = -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> ist,

worin

R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> jeweils Alkyl, Alkoxyalkyl, Cyanoalkyl, Aminoalkyl, Mono- oder Dialkylaminoalkyl, Trialkylammoniumalkyl, Carboxyalkyl, Sulfonsäurealkyl mit jeweils bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, unsubstituiertes oder durch einen oder mehrere Alkyl-, Alkoxy-, Alkoxyalkyl, Cyano-, Cyanoalkyl-, Aminoalkyl-, Amino-, Mono- oder Dialkylamino-, Mono- oder Dialkylaminoalkyl-, Trialkylammonium-, Trialkylammoniumalkyl-, Carboxy-, Carboxyalkyl, Sulfonsäure-, Sulfonsäurealkyl-, Acetoxy- oder Acetamino-Gruppe(n) substituiertes Phenyl mit bis zu 10 C-Atomen in der Alkylgruppe, einen cyclischen oder bicyclischen Rest mit 5 bis 10 C-Atomen, worin eine oder mehrere CH- oder CH<sub>2</sub>-Gruppen durch N oder NH, N oder NH und S, oder N oder NH und O ersetzt sind, oder ein Sulfonsulfid der Struktur -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH mit n = 2-6 bedeuten und einer der Reste R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> auch H bedeuten kann, wobei R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> so aufeinander abgestimmt sind, daß entweder beide Reste sauer oder basisch oder einer oder beide der Reste neutral sind.

3. Verfahren zur Gewinnung von hochreinem, virusinaktiviertem α<sub>1</sub>-Antitrypsin mittels Anionenaustauscher-Chromatographie,

- wobei die α<sub>1</sub>-Antitrypsinhaltige Fraktion, insbesondere Cohn IV-1-Fraktion, aus einer wäßrigen Lösung (Auftragungspuffer) auf eine Chromatographie-Säule, die mit einem Anionenaustauscher wie in mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 beschrieben, beschickt ist, gegeben wird

- unter Bedingungen relativ geringer Ionenstärke,

- gefolgt von mindestens einem Waschschrift mit einer Lösung entsprechend 5 bis 35 mM Natriumchlorid und Natriumacetat in der Nähe des pK<sub>s</sub>-Wertes der Essigsäure,

- gefolgt von einer Elution mit einer Lösung höherer Ionenstärke entsprechend 50 bis 300 mM Natriumchlorid in 25 bis 37 mM Tris/HCl in alkalischem Milieu (pH 7,4 bis 9,2), gegebenenfalls gefolgt von Entsalzungsschritten und üblicher Konzentrierung wie Lyophilisation.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei vor der chromatographischen Reinigung eine Virusinaktivierungs- und/oder alkalische Vorbehandlung der Cohn IV-1-Fraktion erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei die chromatographischen Reinigungsschritte mittels Membran-Chromatographie durchgeführt werden, wobei im ersten Chromatographieschritt mit Anionenaustauschergruppen modifizierte Membranen und im zweiten Chromatographieschritt mit hydrophoben Gruppen modifizierte Membranen eingesetzt werden.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei die Membranen als Disks ausgebildet sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei die Membranen aus modifizierten Cellulose- und/oder synthetischen Fasern und/oder aus Kunstfasern aus Polyglycidylmethacrylat aufgebaut sind.